

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

A4

(11)Publication number : 63-032492

(43)Date of publication of application : 12.02.1988

(51)Int.Cl.

C12P 7/42
// (C12P 7/42
C12R 1:46)

(21)Application number : 61-177346

(71)Applicant : AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL

(22)Date of filing : 28.07.1986

(72)Inventor : YAMAZAKI YUKINAE
MAEDA HIDEKATSU

(54) PRODUCTION OF LEVOROTATORY OPTICALLY ACTIVE ISOMER OF MANDELIC ACID BY ENZYMATIC PROCESS

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable the production of levorotatory mandelic acid useful as a raw material or synthetic intermediate for pharmaceuticals, in high efficiency, from benzoylformic acid, by using an enzyme extracted from microorganism belonging to Streptococcus genus.

CONSTITUTION: The objective benzoylformic acid reductase can be produced by culturing Streptococcus faecalis (IFO 12964) e.g. in tomato juice medium at 30° C for 15W25 hr under shaking, collecting the microbial cells and disintegrating the cells by ultrasonic treatment, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A)

昭63-32492

⑫ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)2月12日

C 12 P 7/42
// (C 12 P 7/42
C 12 R 1:46)

7236-4B

審査請求 有 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 酵素法によるマンデル酸の左旋性光学活性体の製造方法

⑮ 特 願 昭61-177346

⑯ 出 願 昭61(1986)7月28日

⑰ 発 明 者 山 崎 幸 苗 茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

⑱ 発 明 者 前 田 英 勝 茨城県筑波郡谷田部町東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

⑲ 出 願 人 工 業 技 術 院 長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

⑳ 指定代理人 工業技術院微生物工業技術研究所長

明 細 書

1. 発明の名称

酵素法によるマンデル酸の左旋性光学活性体の製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) ストレプトコックス属細菌の菌体から抽出したベンゾイルギ酸還元酵素の存在下、還元型のニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチドを用いてベンゾイルギ酸を還元することを特徴とするマンデル酸の左旋性光学活性体の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔技術分野〕

本発明は、ペニシリン系やセファロsporin系抗生物質又はエフェドリン等の交感神経作用薬等の医薬品の原料もしくは合成中間体として有用なマンデル酸の左旋性光学活性体[(R)-左旋性マンデル酸](以下、単に左旋性マンデル酸という)を酵素を利用して工業的に有利に製造する方法に関するものである。

〔従来技術〕

左旋性のマンデル酸の製造法としては、ラセミ体の分別結晶による光学分割法、クロマトグラフィーによる光学分割法、有機化学的な不斉合成法等が知られているが、これらの方法は、操作が煩雑であるとか、収率が低い、生成物の高純度が低い等の欠点を有している。

一方、左旋性のマンデル酸を得るために、ベンゾイルギ酸を微生物菌体を用いて不斉還元する方法(特開昭57-198096号公報)も知られている。この方法によれば、前記の公知方法の欠点は除去されるものの、微生物のプロテアーゼによる自己消化のための活性低下が避けられず、また菌体内成分や培地成分による製品の汚染・純度低下の問題等が残る。

〔目 的〕

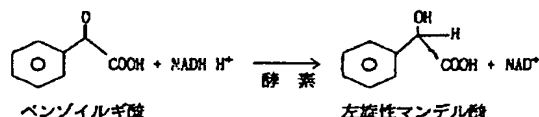
そこで、本発明者らは、微生物菌体を用いず、微生物から取出した酵素を用いてベンゾイルギ酸を還元して左旋性マンデル酸を製造すべく鋭意研究を重ねた結果、ストレプトコックス属に属する微生物から取出した酵素がその目的に適合するこ

とを見出し、本発明を完成するに到った。

〔構成〕

即ち、本発明によれば、ストレプトコッカス属細菌の菌体から抽出したベンゾイルギ酸還元酵素の存在下、還元型のニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチドを用いてベンゾイルギ酸を還元することを特徴とするマンデル酸の左旋性光学活性体の製造方法が提供される。

本発明は、ストレプトコッカス属に属し、ベンゾイルギ酸還元酵素生産能を有する細菌に含まれているベンゾイルギ酸還元酵素(以下、単に酵素Aという)を抽出し、この酵素Aの存在下、還元型のニコチンアミド・アデニン・ジムクレオチド(NADH)を還元剤として用いて次式の反応を触媒させて左旋性マンデル酸を合成することを骨子とするものである。



て考慮しなければならぬ。(1) ペンゾイルギ酸還元酵素、(2) NADH再生システム、及び(3) 反応の実施条件の3つである。まず(1)のペンゾイルギ酸還元酵素はストレプトコックス属の細菌の菌体を破壊し抽出することによって調製する。このために用いる菌株として、例えばストレプトコックス・ファエカリス(*Streptococcus faecales*)が挙げられる。培地及び培養条件としては菌体の増殖が良く、目的の酵素活性が高いのであればどのようなものでもよく、例えば、トマトジュース培地を用いて30℃で15~25時間振とう培養するなどの方法が挙げられる。集菌した菌体の破壊には超音波処理など通常の方法を用いればよく、このようにして可溶化された目的酵素を精製するためには、アフィニティークロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーなど通常の方法を用いればよい。この精製は、必ずしも目的酵素を単一の蛋白質として単離するほどに行うことを必要としない。普通には、菌体由来する低分子成分、多糖類、核酸及びプロテアーゼやNADHオキシダーゼなど

本発明の特徴は次の通りである。即ち、本発明によれば純化した酵素を使用しているため、他の酵素の作用による(+)－異性体の副生がなく生成する左旋性マンデル酸は、完全に100%の光学純度を有する。また副反応や代謝による基質や生成物の消費がないから、反応収率は極めて高く、反応混合物のガスクロマトグラフィーによる分析では反応条件によればほぼ100%の変換収率が達成されていることが明らかにされているほか、結晶化の収率も通例85%以上であり、95%近い値に達する場合もある。本発明における生成物は反応に無関係な菌体成分や培地成分によって汚染されることがなく、有機溶媒による抽出物を濃縮後ただ再結晶するのみで容易に純品とすることができる。さらに、反応液として適当な緩衝液を使用すれば、 NAD^+ の NADH への再生系を共存させるという実際の使用条件下においては、反応液のpH変動はほとんどなく、pHの維持・調節のためのめんどろな操作を必要としない。

本発明を実施するにあたっては次の3点につい

どの妨害作用をなす酵素を除いて、比活性を1000 /mg程度に上昇させたものでも十分である。このためには例えば色素結合樹脂によるアフィニティクロマトグラフィーが効果的である。しかし本発明は、これらの記述によって何ら限定されるものではない。次に(2)のNADH再生システムは、ベンゾイルギ酸に対するNADHの使用量が等モル又はそれ以上である場合には必要ない。しかし、NADHのコストの点からそのような使用法は実際にはありえず、反応産物の酸化型NAD(NAD⁺)をその場で還元してNADHに再生するようにして使用しなければならない。このためにNADH再生システムが必要である。このようなシステムとしては、亜二チオン酸ナトリウムによる化学的な還元システム、電解還元を利用するシステム、アルコール脱水素酵素、グルコース脱水素酵素又はギ酸脱水素酵素などの脱水素酵素を利用するシステムなどがあり、場合に応じて適当なシステムを使用すればよい。最後に、(3)の実施条件について説明する。まず緩衝液を選定するが、中性付近で通常用いられるもの

ならどのようなものでもよく、例えばリン酸緩衝液やトリス・塩酸緩衝液などが挙げられる。緩衝液の濃度は数mMから2~300mMの範囲で適当に選ばれよい。これよりも高濃度であってもさしつかえない。pHは4から8の間の適当な値とする。どの値にするかは、実施にあたって要求される反応速度と酵素の安定性及びNADH再生システムのそのpHに対する適合性を考慮して決定する。本発明に用いるベンゾイルギ酸還元酵素の至適pHは4.5付近であり、また加熱に対して最も安定となるpHは5.8~6.0である。しかしNADHが酸性において不安定であることを考えると、あまりpHを低くすることは好ましくない。この緩衝液にベンゾイルギ酸をナトリウム塩やカリウム塩など適当な塩の形として溶解させる。その濃度は、ミカエリス定数(30℃、pH7.5で3.3mM)の10倍程度(約30mMないしは0.5%)から100倍程度(約300mMないし5%)とすることが实际的である。もちろんこの範囲以上でも以下でもさしつかえない。NADH(又はNAD⁺)の濃度は使用するNADH再生システムの活性強度や安定性

で0.1~2mM程度のメルカプトエタノール及び/又は0.05%程度の牛血清やアルブミンを添加しておくことが望ましい場合がある。またメルカプトエタノールの代りにジチオスレイトールを用いてもよい。ベンゾイルギ酸還元酵素及び再生反応を酵素法で行う場合のその酵素のそれぞれの使用量は、要求される反応速度に応じて適当に決めればよい。なお、基質、酵素の混合順序は上の通りである必要はなく、場合に応じて適当に行えばよい。反応温度の上限は40℃付近とする。これより高温だとベンゾイルギ酸還元酵素の失活がすみやかである。通常は30℃前後で反応を行うとよい。反応が完結するまでに要する時間は用いた酵素量によって違ってくることは当然である。反応終了後生成物の左旋性マンデル酸を単離するのには、有機溶媒抽出など通常の方法を応用すればよい。例えば、反応液を希塩酸や希硫酸などでpH2~1の酸性とし、次で食塩などの塩を飽和濃度にまで溶かしこんだ酢酸エチルやエーテルなどで抽出を行うと、反応液中のマンデル酸はほぼ定量的に回収される。有

及び全反応速度として要求される反応速度等を考慮して適当に決定すればよいが、普通には、ベンゾイルギ酸還元酵素におけるミカエリス定数(30℃、pH7.5で35μM)の10~100倍程度の濃度とすれば十分である。もちろんこれよりもはるかに低い値にして、回転数(ターンオーバーナンバー)を向上させることもさしつかえない。次にNADH再生システムに必要な試薬又は基質を反応液に添加する。例えばアルコール脱水素酵素を再生システムに使用する場合には、その酵素の基質であるエタノールを添加する。濃度としては、原料のベンゾイルギ酸の濃度以上であって、かつ再生反応が円滑に進行するような濃度とする。なお、ベンゾイルギ酸と再生反应用基質を反応液に添加するにあたっては、反応開始前に一度に全量を添加してもよく、また反応の進行に伴って逐次回分添加するようにしてもよい。このようにして原料のベンゾイルギ酸、NADH(又はNAD⁺)及び再生反应用的試薬又は基質を溶解させた反応液の準備ができれば、酵素を添加して反応を開始する。その前に安定化剤とし

機層を分け取り、溶媒を留出した残渣を熱したベンゼンなどに溶解させ、必要があれば活性炭処理を施した上で熱濾過を行い、濾液を冷却すれば左旋性マンデル酸の美麗な板状品を得る。

【実施例】

次に実施例について本発明をさらに詳細に説明する。

実施例1

ストレプトコックス ファエカリス(*Streptococcus faecalis* IF0 12964)をトマトジュース・麦芽エキス・CoSO₄の培地で通気攪拌培養した。30℃で24時間培養後、集菌し、菌体を超音波処理してベンゾイルギ酸還元酵素を抽出した。これをMatrex Red A樹脂を充填したカラムによるアフィニティクロマトグラフィーと、DEAE-セファローズカラムによるイオン交換クロマトグラフィーを順次行って比活性911U/mgの製品を得た。このものの一部(67U)をとり、0.5%の牛血清アルブミンと2mMのメルカプトエタノールを含む15mMリン酸緩衝液(pH6.3)の15mLに溶解させておいた。一方、1gのベンゾ

イルギ酸と0.26gNaOH、及び3.9mLのエタノールを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)の20mLと混和して、1NNaOHにてpHを7.5に調節した。上記pH7.5のリン酸緩衝液で約100mLに希釈後、250mgのNADH、15mLの上記酵素液、0.333mLの酵母アルコール脱水素酵素懸濁液(350U、ベーリンガー社製)及び1Mのメルカプトエタノール水溶液0.26mLを加え、最後に上記リン酸緩衝液(pH7.5、0.1M)で全量を133mLとした。トルエン0.6mLを加え密栓して30℃に2日放置した。6NHC₂H₅の5mLを加えてpHを2以下とし、次で塩化ナトリウムを飽和になるまで溶解させた。これを200mL、200mL及び100mLの酢酸エチルで3回抽出した。抽出時に析出した不溶分はセライトを濾過助剤として用いて濾去した。有機層を合せ、硫酸ナトリウム上で一夜乾燥した。硫酸ナトリウムを濾別し、溶媒を減圧留去して得られた結晶性残渣を沸とうベンゼンの約50mLにとかし、少量の活性炭を加えて熱時に濾過し、濾液を室温に放置しておくで790mgの板状品を与えた。母液を濃縮してさらに64mgの結晶を得た。

えて中和した。上記緩衝液で約100mLに希釈後、250mgのNADH、67Uのベンゾイルギ酸還元酵素を含む15Mリン酸緩衝液の15mL(pH6.3;酵素の他に0.5%の牛血清アルブミンと2mMのメルカプトエタノールを含む)、140mgのギ酸脱水素酵素凍結乾燥物(80U、ベーリンガー社製)及び1Mのメルカプトエタノール水溶液の0.26mLを加え、最後に上記0.1Mリン酸緩衝液で全量を133mLとした。トルエン0.6mLを加えて密栓し、30℃に2日間保った。生成したマンデル酸を実施例1と同様にして抽出して結晶化を行い(活性炭処理ははぶいた)、総計940mgの板状品を得た(収率93%)。mp133~134℃。IRスペクトルと比旋光度($[\alpha]_D^{25} = -150^\circ$ (C=1.1, 水))は標準品のデータに一致した。また実施例1と同様にして100%R-エナンチオマーから成ることを確認した。

実施例3

1gのベンゾイルギ酸を約5mLの水にとかし、2N NaOHで中和した。0.2Mのグルコース、0.2MのNaC₂H₅、2mMのメルカプトエタノール、及び0.05%の牛血清ア

収率84%。mp(134~135℃)とIRスペクトルはアルドリッチ社から購入した(R)-(-)-マンデル酸の標準品のそれに一致した。また比旋光度は $[\alpha]_D^{25} = -149^\circ$ (C=1.0, 水)であり、標準品の比旋光度に一致した。さらに光学純度を精密に決定するために、サンプルの少量をジアゾメタンでメチル化し、次で(R)-(+)-メトキシトリフルオロフェニルアセチルクロライドでジアステレオメリックなHTPAエステルとしてガスクロマトグラフィーで分析した(カラム:化学結合型OV-1キャピラリーカラム、0.25mm×25m;キャリアガス:ヘリウム、入口圧:1.4kg/cm²、入口流速:80mL/min、カラム温度:175℃;保存時間:R-エナンチオマーについて14.70分、S-エナンチオマーについて15.45分)。その結果、本例において合成されたマンデル酸は100%R-エナンチオマーから成ることを確認した。

実施例2

1gのベンゾイルギ酸と1.5gのギ酸を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)の20mLと混和し、等量のNaOHを加

ルブミンを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH7.5)の160mLを加えた。これにNADHの250mgを添加し、次で88Uのグルコース脱水素酵素(天野製薬製)及び64Uのベンゾイルギ酸脱水素酵素を少量の緩衝液溶液として添加した。よく攪拌して均一溶液とした後、トルエン0.8mLを加えて密栓し、30℃に24時間放置した。生成したマンデル酸を実施例1と同様にして抽出して結晶化を行い、総計902mgの板状品を得た(収率89%)。mp132~134℃、 $[\alpha]_D^{25} = -149^\circ$ (C=1.0, 水)。

実施例4

ベンゾイルギ酸の2.5gとギ酸の2.3gを2mMのメルカプトエタノールを含む15mMのリン酸緩衝液(pH6.3)の約20mLと混和し、次でNaOHの約2.7gを加えて中和した。ベンゾイルギ酸還元酵素56U、0.5%牛血清アルブミン及び2mMメルカプトエタノールを含む上記リン酸緩衝液の21mLを加えた。1NNaOHでpH7.5に調整し、NADH250mgとギ酸脱水素酵素の凍結乾燥粉末70mg(80U、ベーリンガー社製)を加え均一溶液とした。全液量は45mLとなった。

トルエン1mlを添加し、栓をして30℃に42時間保った。6NHC₂約2.5mlを加えて、pH<2とし、NaC₂を飽和になるように溶かし、酢酸エチルの150ml、150ml及び100mlで3回抽出した。有機層を合し、実施例1と同様に処理、結晶化させて、左旋性マンデル酸の板状晶2.30gを得た。収率91%、mp133℃、 $[\alpha]_D^{25} = -150.5^\circ$ (C=1.04、水)。

【効 果】

以上のように、本発明によれば、ベンゾイルギ酸を原料とし左旋性マンデル酸を光学純度100%でかつ高収率で製造することができる。

特許出願人 工業技術院長 飯 塚 幸 三
指定代理人 工業技術院微生物工業技術研究所長
佐 藤 昭 雄